

氏 名 藤野 幸宏

授与した学位 博 士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博乙第4178号

学位授与の日付 平成19年 3月23日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第4条第2項該当)

学位論文の題目 実用レベルで利用できるブタ胚の長期保存技術の確立

論文審査委員 助教授 舟橋 弘晃 教授 国枝 哲夫 助教授 阿部 浅樹

学位論文内容の要旨

ブタにおける胚移植技術はブタ遺伝資源の有効利用、疾病等の事故からの回避および豚群の維持コストを大幅に削減する技術として確立が望まれているが、技術の応用には胚の長期保存技術の確立が欠かせない。ブタ胚は低温に対する感受性が極めて高いことから、冷却・加温時に生ずる様々な障害を軽減する技術の開発が必要である。また、胚の耐凍性は発育ステージによって大きく異なることが示唆されているが、その他の要因の関与も考えられることから、これらを明らかにする必要がある。さらに、多胎動物であるブタでは、胚の移植において胚を1個または2個移植した場合、受胎率が顕著に下がることが示されており、人為操作等により少数の胚を作出した場合、子豚を得ることが難しい。本研究では、再現性の高いブタ胚の長期保存技術を確立することを目的として、これらの問題を検討した。まず、哺乳動物精液の凍結保存において障害から精子を保護する物質として広範囲に用いられている卵黄を、凍結媒液中に耐凍剤とともに添加し、冷却および凍結時におけるブタ胚の生存性への影響を検討した。その結果、卵黄はブタの拡張胚盤胞や脱出胚盤胞を0℃に冷却した際の生存性を改善し、卵黄とグリセリンを添加した凍結媒液で緩慢凍結したブタ胚の移植により、脱出胚盤胞由来の子豚1頭が得られた。この実験から、凍結溶液への添加物としての卵黄の使用は、凍結・融解した胚から子豚を生産する際に貢献する可能性があると考えられた。次に、ブタ胚の耐凍性には、胚の発育ステージが強く影響していることが示唆されていることから、特定の発育ステージの胚を効率的に回収する技術を検討した。その結果、未經産豚をeCGおよびhCGにより処置し、hCGから胚を回収するまでの経過時間を設定することにより、目的とする発育ステージの胚を効率的に回収されることができ、桑実胚の回収には経過時間を140時間に、透明帯を脱出する直前および脱出直後の胚盤胞の回収には171時間に設定すればいいことが明らかにされた。次に、1頭の供胚ブタから1回に回収した胚を1バッチと定義し、バッチ毎の胚の耐凍性を効率よく推定評価するシステムの構築を目指した。その結果、緩慢凍結したブタ拡張胚盤胞および脱出胚盤胞の子ブタへの発育割合はバッチにより大きく異なるものの、バッチごとに無作為に抽出し緩慢凍結した拡張胚盤胞2個の体外培養後の生存率を調べることは、同一バッチにおける母集団の移植後の生存性（受胎率および子豚の生産率）の推定評価に利用可能であることを明らかにした。さらに本研究では、手法が簡単で特別な器具を用いずに実施できる方法として、ブタ胚をステンレス製の網に付着させて液体窒素中に投入し、急速冷却してガラス化する方法(MMV法)を考案した。MMV法でガラス化した拡張胚盤胞(84%)は桑実胚(55%)よりも高い生存性を示し胚の発育ステージによる影響が示唆されたが、ガラス化した拡張胚盤胞200個の移植により37頭の生存子豚が得られた。また、ブタ胚の移植においては、新鮮胚4個を補助胚として凍結・融解胚と同時に移植することで、耐凍性の低い胚を用いた場合でも凍結・融解後に生存産子にまで発生させることが可能となった。以上の研究の結果、緩慢凍結法およびMMV法により、液体窒素中に保存したブタ胚の移植により子豚を得ることができ、ブタ胚を再現性高く長期保存できるシステムを構築することができた。

論文審査結果の要旨

本提出論文は、低温感受性が極めて高く、凍結融解した場合に生存胚を得ることが長く非常に難しいとされていた、ブタ胚の凍結による長期保存技術の開発についての成果をまとめたものである。

先ず、精子の凍結保存で確認されていた卵黄による凍結保護効果がブタ受精卵でも適応可能か否かについて検討し、脱出胚盤胞期胚を卵黄存在下で緩慢凍結・融解することで高い生存率が得られることを見出し、世界で最初に凍結融解したブタ胚の受精卵移植による産子の生産を報告した。次に、耐凍能が比較的高いことが明らかになった脱出胚盤胞期胚を効率的に得るためのプログラムの開発に取組み、大規模な実験を行った結果、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン投与から171時間後に効率的に脱出胚盤胞期胚を採取できることを明らかにした。また、ブタ胚の耐凍能は、個体差やロット差が大きいことを見出したことから、それらを効率的に評価し、耐凍能の高い胚のみを移植できる実用システムの開発に取組み、一腹当りに採取したブタ胚のうち2個を別に凍結し、それらの融解後の生存性が同時に回収された同腹胚の凍結融解後の生存性および受精卵移植後の受胎率と高い相関があることを明らかにし、実用的なブタ胚の耐凍能の評価システムを開発した。またさらに、ブタ胚の耐凍能の差を縮めるような凍結法を探究し、金属製のメッシュを用いた新たな急速冷却によるガラス化凍結法を開発し、拡張胚盤胞期胚を用いた場合、従来の緩慢凍結法ではブタ胚の耐凍能に差が認められた胚でさえ、融解後の生存率を高率に安定させることが出来、移植後も正常な産子が得られることを明らかにした。

以上の知見は、実用的かつ効率的なブタ胚の凍結保存による長期保存技術として、さらにそれに係わる基礎資料として、高く評価できる。また、本提出論文が明らかにした知見は、人類にとって重要な肉資源の一つであるブタの生殖資源の保存と改良に役立ち、産業上も極めて意義深いものである。

以上のことから、本学位審査委員会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文は、博士（農学）の学位に値すると判断した。